

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-039416

(43)Date of publication of application : 08.02.2000

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

C12Q 1/26

C12Q 1/44

(21)Application number : 11-140672

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 20.05.1999

(72)Inventor : YAMAMOTO TOMOHIRO  
YOSHIOKA TOSHIHIKO  
NANKAI SHIRO

(30)Priority

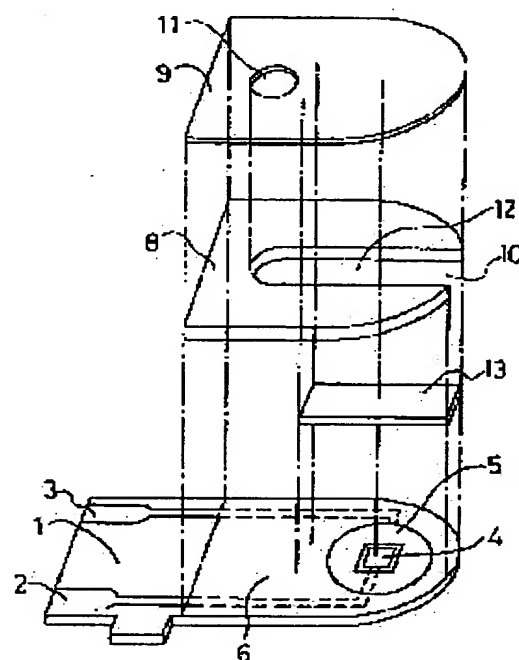
Priority number : 10139977 Priority date : 21.05.1998 Priority country : JP

(54) BIOSENSOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the solubility of a reagent for rapid measurement by forming a sample liquid supply path between an insulation substrate where an electrode system is provided on it and a cover member and arranging a carrier for carrying the reagent in the supply path.

SOLUTION: A silver paste is printed on an insulation substrate 1 for forming leads 2 and 3 and the electrode system ground, and a conductive carbon paste including a resin binder is printed on the insulation substrate 1, thus forming an electrode system including a measurement electrode 4 and a counter electrode 5. Also, an insulation paste is printed to form an insulation layer 6. A space part for constituting a sample liquid supply path is formed at the part of a slit 12 of a spacer 8 between this sort of insulation substrate 1 and a cover 9, a carrier 13 is arranged at the space part, and a biosensor is created. In this case, the carrier 13 is made of fiber for carrying a reagent including an oxidation reduction enzyme and the sample liquid can be easily introduced into a part in the sensor simply by allowing the sample liquid to touch an opening part 10 that becomes a sample liquid supply path port.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-39416

(P2000-39416A)

(43)公開日 平成12年2月8日(2000.2.8)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

FI

テマ-ト\*(参考)

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 U

C 1 2 Q 1/26

C 1 2 Q 1/26

1/44

1/44

G 0 1 N 27/30

3 5 3 R

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平11-140672

(22)出願日 平成11年5月20日(1999.5.20)

(31)優先権主張番号 特願平10-139977

(32)優先日 平成10年5月21日(1998.5.21)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 山本 智浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72)発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72)発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(74)代理人 100072431

弁理士 石井 和郎

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【課題】 迅速な測定が可能で、保存性の優れたバイオセンサを提供する。

【解決手段】 本発明によるバイオセンサは、少なくとも測定極と対極を有する電極系を形成した絶縁性の基板、前記基板に組み合わされて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材、および少なくとも酸化還元酵素を含む試薬を担持する繊維からなる担体を具備し、前記担体が前記試料液供給路内に配置されている。また、前記担体を少なくとも2つの担体部片から構成し、それぞれの担体部片に異なる試薬を担持させる。

8 スペーサ

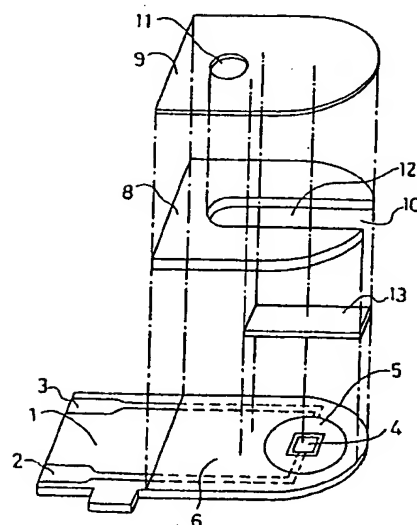
9 カバー

10 試料液供給路の開口部

11 空気孔

12 スリット

13 担体



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも測定極と対極を有する電極系、前記基板に組み合わされて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材、および少なくとも酸化還元酵素を含む試薬を担持する繊維からなる担体を具備し、前記担体が前記試料液供給路内に配置されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素を含む試薬を担持する繊維からなる担体を具備し、前記担体が接着剤によって前記電極系の近傍に固定されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項3】 前記担体が、少なくとも2つの担体部片から構成され、それぞれの担体部片が異なる試薬を担持している請求項1または2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記試薬が、少なくともコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、および電子メディエーターを含み、前記接着剤が、界面活性剤である請求項2または3記載のバイオセンサ。

【請求項5】 前記試薬が、少なくともコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、および電子メディエーターを含み、酸化還元酵素と電子メディエーターとが別の担体部片に担持されている請求項3または4記載のバイオセンサ。

【請求項6】 前記試薬が、少なくともコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、界面活性剤および電子メディエーターを含み、コレステロールエステラーゼを含む担体部片が界面活性剤を含む請求項3〜5のいずれかに記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中の測定対象物について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施できるバイオセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方式として、次のようなバイオセンサが提案されている（特開平2-062952号公報）。このバイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷等の方法で測定極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に、親水性高分子と酸化還元酵素および電子メディエーターを含む酵素反応層を形成したものである。この酵素反応層には必要に応じて緩衝剤が加えられる。

【0003】 このようにして作製されたバイオセンサの酵素反応層上に、基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これに伴い電子メディエーターが還元される。酵素反応終了後、この還元された電子メディエーターを電気化学的に酸化し、こ

のとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。このようなバイオセンサは、測定対象物質を基質とする酵素を選択することによって、様々な物質に対する測定が原理的には可能である。例えば、酸化還元酵素にグルコースオキシダーゼを用いれば、血液中のグルコース濃度を測定するバイオセンサを構成することができる。このセンサは、グルコースセンサとして、広く実用化されている。

【0004】 また、酸化還元酵素にコレステロールオキシダーゼを用いれば、血清中のコレステロール濃度を測定するバイオセンサを構成することができる。通常、各種医療機関において診断指針に用いられる血清コレステロール値は、血清中のコレステロール濃度とコレステロールエステル濃度を合計したものである。コレステロールエステルは、コレステロールオキシダーゼによる酸化反応の基質になることができないため、反応層にコレステロールオキシダーゼを含ませた構成のバイオセンサでは、診断指針としての血清コレステロール値を測定することができない。このため、コレステロールエステルをコレステロールに変化させる過程が必要である。この過程を触媒する酵素として、コレステロールエステラーゼが知られている。このコレステロールオキシダーゼをコレステロールオキシダーゼとともに酵素反応層中に含ませることによって、血清中の総コレステロール濃度を測定するバイオセンサを構成している。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上記のような構成のバイオセンサの酵素反応層は、酸化還元酵素や電子メディエーターなどを含む混合水溶液を前記電極系上に滴下し乾燥して形成している。そのため、試薬の量が多くなると試料液を反応層に滴下したとき反応層が迅速に溶解せず、測定に長時間を要するという問題がある。特に、上記のような血清中の総コレステロール濃度を測定するセンサの場合、酵素反応層中にコレステロールオキシダーゼとコレステロールエステラーゼの計2種類の酵素を含有させなければならないことから、試薬の担持量が非常に多くなり、そのため試料液滴下後の酵素反応層の溶解に非常に長い時間を必要とし、迅速な測定をおこなえない。

【0006】 また、酸化還元酵素や電子メディエーターなどの試薬が酵素反応層中に混合した状態で担持されると、試薬が変性することがある。特に高温下で長期間保存した場合などでは、試料液中に酵素反応の基質が含まれない場合でも大きな電流値が観測されるなどセンサ応答が悪化するという問題がある。本発明は、上記課題を鑑み、試薬の溶解性を高めて、迅速な測定を可能にするバイオセンサを提供することを目的とする。また、長期間保存した後も優れた応答特性を維持するバイオセンサを提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明によるバイオセンサは、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも測定極と対極を有する電極系、前記基板に組み合わされて基板との間に前記電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材、および少なくとも酸化還元酵素を含む試薬を担持する繊維からなる担体を具備し、前記担体が前記試料液供給路内に配置されていることを特徴とする。本発明による他のバイオセンサは、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた少なくとも測定極と対極を有する電極系、および少なくとも酸化還元酵素を含む試薬を担持する繊維からなる担体を具備し、前記担体が接着剤によって前記電極系の近傍に固定されていることを特徴とする。また、前記担体が、少なくとも2つの担体部片から構成され、それぞれの担体部片が異なる試薬を担持する。

#### 【0008】

【発明の実施の形態】本発明によるバイオセンサは、担体を構成する繊維の表面に、酸化還元酵素などの試薬を分散して付着させた形態で担持するものである。このような構成をとることによって、試料液と接する試薬の表面積が広くなり、試料液への試薬の溶解性が向上する。このように試薬を担体の表面に分散して担持するには、担体に滴下する試薬溶液の濃度を適宜調整するとよい。担体には、それ自体がバイオセンサ内で生じる酵素反応および電気化学的反応に不活性であるものが好ましく、セルロース繊維、ガラス繊維または高分子化合物からなる繊維をフリース状またはフェルト状に積層したシートを用いるのが好適である。また、センサ内に試料液が導入された時、担体内に迅速に試料液が浸透する空隙率を有するものを選択するのが好ましい。例えば、ガラス繊維からなる濾紙を用いた場合は、空隙率が70～95%程度のもを用いるとよい。なお、後述するように担体をバイオセンサの試料液供給路内に嵌合させて保持させる場合があるため、担体は多少の弾力性を持つのが好ましい。

【0009】本発明による他のバイオセンサは、複数の担体を用意し、酸化還元酵素や電子メドオエーターなどを別々の担体に担持させ、それぞれを分離した状態でバイオセンサ内に含ませるものである。このような構成をとることによって、試料液への試薬の溶解性が向上するとともに、保存中における試薬の変性を抑制できる。

【0010】バイオセンサ内における担体の配置に関しては、種々の変形が可能である。一つの形態は、前記カバー部材の試料液供給路内に担体を嵌合させるもので、もう一つの形態は、前記カバー部材の試料液供給路に露出する側の面や、基板上の電極系の近傍に接着剤を用いて担体を固定するものである。担体を嵌合させる場合は、担体を前記カバー部材の試料液供給路と同じ形状に成型し、これを試料液供給路内にはめ込むことにより、カバー部材に固定する。このような方法を用いると、工

程を簡略化でき生産性を向上させることができる。複数の担体を用いる場合は、カバー部材の試料液供給路よりも小さく成型した担体を用意し、個々の担体を適宜組み合わせて、試料液供給路内にはめ込むとよい。例えば、試料液供給路と幅が等しく長さが短い担体を試料液が流入する側から順に配置し、試料液が各担体を順番に浸透するようにしたり、試料液供給路と長さが等しく幅が短い短冊形の担体を試料液の流れに沿うように配置したりするとよい。特に、迅速に試料液が浸透して試薬を溶解し、かつ溶解した試薬の混合が均一におこなわれやすいという点から、後者の配置が好ましい。また、厚さの薄い担体を用意し、この担体をカバー部材の試料液供給路と同じ形状に成型した後、それぞれ重ねて試料液供給路内にはめ込んだりしてもよい。なお、異なる試薬を担持した担体をそれぞれいくつかに分割した後、異なる試薬を担持する担体同士が隣り合うように配置すると、試料液に溶解した試薬が混合しやすく好適である。

【0011】接着剤を用いて担体を固定する場合は、接着剤や担体が電極反応に影響を及ぼさないように、電極系を除いた部分に担体を固定する。用いる接着剤には、センサ作製時の環境において、担体にしみこまないような高粘性のもの、例えば、木工用接着剤を用いるのが好適である。このような接着剤を用いて担体を固定すると、試料液が進入してきたときの担体自体の膨潤などにより、担体が移動して電極系に接触して電極応答が阻害されるのを防ぐことができる。なお、複数の担体を用いる場合は、個々の担体を離して配置してもよい。

【0012】また、基板に電極系と反応層を形成しただけの、カバー部材のないタイプのセンサの場合は、種々の形状の担体を用いることができる。ただし、担体を電極系になるべく近い位置に固定することが好ましい。例えば、内周が電極系の外周よりも大きいドーナツ型の担体を用いるとよい。試薬を分離して担持させる場合には、図9(a)に示すように、担体28と担体29にそれぞれ異なる試薬を担持させ、上下に重ねて固定する。また、図9(b)に示すように、ドーナツ型の担体を縦半分に割った担体30と担体31を用いたり、図9(c)に示すように、内径の異なる担体32と担体33を用いたりするとよい。

【0013】担体に担持される酸化還元酵素には、種々のものを用いることができる。例えば、グルコースオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼ等が挙げられる。血清コレステロール値を測定する場合は、コレステロールオキシダーゼとコレステロールエステル加水分解能を有する酵素を用いる。コレステロールエステル加水分解能を有する酵素には、コレステロールエステラーゼおよびリポプロテインリパーゼ等が挙げられる。特に、コレステロールエステラーゼは、適当な界面活性剤を用いることによって、迅速にコレステロールエステルをコレステロールに変化させることが

できるので都合がよい。

【0014】酸化還元酵素にコレステロールエステル加水分解能を有する酵素を使用する場合、この酵素の活性を向上させる効果を有する界面活性剤を担体に担持される試薬中に含ませると、酵素反応に要する時間を短縮することができて好ましい。例えば、コレステロールエステラーゼの活性を向上させる界面活性剤には、*n*-オクチル-β-D-チオグルコシド、ポリエチレングリコールモノドデシルエーテル、コール酸ナトリウム、ドデシル-β-マルトシド、シュクロースモノラウレート、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、N, N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル) コールアミド、N, N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル) デオキシコールアミドおよびポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェニルエーテルなどを任意に用いることができる。

【0015】上記の界面活性剤の中で、常温で高粘性の液体で、かつ酵素反応を阻害しないものを担体を固定する接着剤に用いると、酵素の活性を向上させるという効果の他に、試料液がセンサ内へ導入されるのを容易にするという利点が得られる。このような界面活性剤には、ポリエチレングリコールモノドデシルエーテルおよびポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェニルエーテル等が挙げられる。

【0016】バイオセンサの電極系を白金などの電気化学的に安定な金属を用いて形成すると、得られる酸化電流値が誤差を含むことがない。しかし、このような金属は高価であるため、使い捨て型のセンサでは、銀ペーストなどを用いて銀電極を形成したのち、これをカーボンペーストで被覆して電極系を形成している。ところが、試料液中に界面活性剤が含有されると、界面活性剤の作用により試料液がカーボン粒子間に浸潤する。その結果、カーボン電極の活性が低下することがある。また、試料液が銀電極に接触する状態になる。このため、この状態で測定極に電圧を印加すると、銀電極が酸化反応を起こして電流を生じ、測定電流値に正の誤差を与える場合が生じる。このような現象を抑制するために、電極系表面を親水性高分子で被覆する方法がある。この親水性高分子は、試料液が導入されても粘稠な層となって試料液が電極に接触するのを抑制する。このような親水性高分子には、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン、ポリアクリル酸およびその塩、デンプンおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩、ポリアクリルアミド、メタクリレート樹脂およびポリ2-ヒドロキシエチルメラクリレートなどが挙げられる。

【0017】上記の親水性高分子層を覆うように、レシチン等の両親媒性物質を有機溶媒に溶解した溶液を滴下し乾燥して両親媒性物質層を設けると、試料液の導入を

円滑におこなうことができよい。このような両親媒性物質としては、レシチンをはじめとするリン脂質等がある。

【0018】バイオセンサの電極系を白金などで形成する場合、試料液中の溶存酸素を利用して基質濃度を測定することができる。しかし、電極系を銀およびカーボンで形成する場合は、溶存酸素から生成した過酸化水素の酸化電流値を測定するのは非常に困難である。また、溶存酸素の量は少ないため、基質濃度が高い場合、正確な数値を得ることができない。そのため、バイオセンサの電極系を銀およびカーボンで形成する場合は、担体に担持される試薬中に電子メディエーターを含有させる。このような電子メディエーターには、フェリシアン化イオン、*p*-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェートおよびフェロセンなど水溶性で、酵素-電極間の電子移動を媒介しうる化合物を任意に使用できる。

【0019】上記した種々の試薬は、混合した状態で担体に担持されているよりも、別々にして担持させる方が試薬の変性を抑制することができる。特に、電子メディエーターを酵素類を担持する担体とは別の担体に担持させると、酵素の変性を抑制する効果が顕著である。また、試薬にコレステロールエステル加水分解能を有する酵素を含ませるときは、この酵素を担持する担体に、この酵素の活性を向上させる働きのある界面活性剤を担持させると、センサの応答性が向上する。なお、上記した試薬をすべて担体に担持させず、その一部を含む層を担体のある位置とは別のところに形成して反応系に含ませてもよい。酸化電流の測定方法としては、測定極と対極のみの二電極系と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

#### 【0020】

【実施例】以下に具体的な実施例を挙げて、本発明を詳細に説明する。図1は、本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた分解斜視図を示している。1はポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板を示す。この基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷してリード2、3および電極系の下地を形成してある。そして、基板1上に、さらに、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷することにより測定極4と対極5を含む電極系を形成し、また、絶縁性ペーストを印刷することにより絶縁層6をそれぞれ形成している。測定極4はリード2に、また対極5はリード3にそれぞれ接続されている。絶縁層6は測定極4および対極5の露出部分の面積を一定とし、かつリードを部分的に覆っている。このようにして電極系を形成した絶縁性基板1と、空気孔11を備えたカバー9、スペーサー8および試薬を担持した担体13を、図1中、一点鎖線で示すような位置関係をもって接着しバイオセンサを作製する。このような構成のバイオセンサでは、基板1とカバー9との間において、スペーサー8のスリット12

の部分に試料液供給路を構成する空間部が形成され、この空間部内に担体13が配置される。そして、試料液供給路口となる開口部10に、試料液を接触させるだけの簡易操作で、試料液は容易にセンサ内部へ導入される。

【0021】図2は、スペーサー8とカバー9を重ね合わせたカバー部材の斜視図であり、図1とは上下逆に配置してある。このカバー部材と基板を組み合わせて、試料液供給路を構成する空間部が形成される。16は、この試料液供給路を構成する空間部に露出する面のカバー側を示す。

【0022】図3は、本発明の一実施例におけるバイオセンサの縦断面図である。図1と同様にして、絶縁性基板1上に電極系を形成し、この電極系上に、親水性高分子層7が形成され、この層7を被覆するようにレシチン層17が形成されている。そして、試料供給路を構成する空間部に試薬を担持した担体13が嵌合されて配置されている。図4は、本発明の他の実施例におけるバイオセンサの縦断面図である。図1と同様にして、絶縁性基板1上に電極系が形成され、この電極系上に親水性高分子層7およびレシチン層17が形成されている。そして、試料液供給路のカバー側の面16に、試薬を担持した担体13が接着剤14によって固定されている。

【0023】図5は、本発明の他の実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた分解斜視図である。図1と同様にして電極系を形成した絶縁性基板1と、空気孔11を備えたカバー9、スペーサー8、および異なる試薬をそれぞれ担持した担体部片21と22を、図5中、一点鎖線で示すような位置関係をもって接着してバイオセンサを作製している。

【0024】《実施例1》本実施例では、図3の構成のバイオセンサを以下のようにして作製した。まず、図1の基板1上の電極系上に、親水性高分子であるカルボキシメチルセルロースのナトリウム塩（以下、CMCと略す。）の0.5wt%水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させ、CMC層7を形成した。続いて、このCMC層7を覆うようにしてレシチンの0.5%トルエン溶液を3μl滴下し、乾燥させてレシチン層17を形成した。次に、図2に示すようなアクリル樹脂製のカバー部材を用意した。開口部10から空気孔11の端部までの長さは4.5mm、スリット12の幅は2.0mm、スリットの深さは0.3mmであった。そして、厚さ0.2mmのガラス繊維からなるフェルト（以下、ガラスフィルタという。）を2×4.5mmの大きさに裁断した。そして、このガラスフィルタをカバー部材のスリット12にはめ込んで固定した。

【0025】このガラスフィルタに、コレステロールオキシダーゼ（以下、ChODと略す。）、コレステロールエステラーゼ（以下、ChEと略す。）、電子メディエーターであるフェリシアン化カリウム、およびコレステロールエステラーゼの反応を活性化させる作用を有す

る界面活性剤であるポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェニルエーテル（以下、Triton X-100という。）を水に溶解させた混合溶液5μlを滴下し、50℃の温風乾燥器中で15分間乾燥させて、試薬を担持する担体13を形成した。そして、このカバー部材と基板1を図1中、一点鎖線で示すような位置関係をもって接着し、バイオセンサを作製した。

【0026】こうして作製したバイオセンサに、試料液3μlを試料供給路の開口部10より供給した。試料液には、市販の標準血清を生理食塩水で希釈して、含有されるコレステロールの濃度を種々変化させたものを用いた。そして、3分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.5Vのパルス電圧を印加し、5秒後に測定極と対極との間に流れる電流値を測定した。その結果、血清中の総コレステロール濃度の増加にともなって電流値も増加し、両者間で優れた直線性を示した。

【0027】《実施例2》本実施例では、図4に示す構成のバイオセンサを以下のようにして作製した。実施例1と同様にして、図1の基板1上の電極系上に、CMC層7およびレシチン層17を順次形成した。次に、実施例1と同様のガラスフィルタを2×4.5mmの大きさに裁断した。そして、試料液供給路のカバー側の面16に、接着剤14として木工用接着剤を塗布した後、ガラスフィルタを接着させ固定した。このガラスフィルタに、実施例1と同様の試薬を溶解した混合水溶液5μlを滴下し、50℃の温風乾燥器中で15分間乾燥して、試薬を担持した担体13を形成した。そして、実施例1と同様にしてバイオセンサを作製し、同様の試料液に対する電流応答を測定した。その結果、図10に示されるように、血清中の総コレステロール濃度に依存した良好な応答値が得られた。

【0028】《実施例3》本実施例では、図4の構成のバイオセンサを以下のようにして作製した。実施例1と同様にして、図1の基板1上の電極系上に、CMC層7およびレシチン層17を順次形成した。次に、試料液供給路のカバー側の面16に、界面活性剤であるTriton X-100のエタノール溶液を滴下した。そして、エタノールを蒸発させることによって、試料液供給路のカバー側の面16に、接着剤の役割をする糊状のTriton X-100層14を形成した。そして、2×4.5mmに裁断したセルロース繊維からなるフェルト（以下、セルロースフィルタという。）をこの層14上に接着して固定した。Triton X-100は常温（約25℃）では液体であるが、粘性が高いため、セルロースフィルタの内部には浸潤しなかった。

【0029】このセルロースフィルタに、実施例1と同様の試薬を溶解した混合水溶液5μlを滴下し、50℃の温風乾燥器中で15分間乾燥させて、試薬を担持した担体13を形成した。そして、実施例1と同様にしてバイオセンサを作製し、同様の試料液に対する電流応答値

を測定した。その結果、血清中の総コレステロール濃度に依存した良好な応答値が得られた。また、界面活性剤によって担体を接着したことにより、試料液の導入は非常に容易であった。

【0030】《実施例4》実施例1と同様にして、図1の基板1上の電極系上に、CMC層7およびレシチン層17を順次形成した。次に、実施例1と同様の厚さ0.2mmのガラスフィルタを2枚用意した。1枚には電子メディエーターであるフェリシアン化カリウムの0.6mol/l水溶液を滴下して均一に浸透させた。そして、50℃の温風乾燥器中で15分乾燥させ、1平方ミリメートルあたり0.33μmolのフェリシアン化カリウムを担持させた。このガラスフィルタを1×4.5mmの大きさに裁断して、フェリシアン化カリウムを含む担体部片21を作成した。次に、残りの1枚に、ChODを400units/ml、ChEを4000units/ml、およびTritonX-100を6wt%含む水溶液を滴下して均一に浸透させた。続いて、50℃の温風乾燥器中で15分間乾燥させ、1平方ミリメートルあたりChODを0.22units、ChEを2.2unitsおよびTritonX-100を0.3mg担持させた。そして、このガラスフィルタを1×4.5mmの大きさに裁断してChOD、ChEおよびTritonX-100を含む担体部片22を作成した。

【0031】この担体部片21および22を、実施例1と同じ形状のカバー部材のスリット12に図6に示すように配置してはめ込み固定した。このカバー部材と基板1を図5中一点鎖線で示すような位置関係をもって接着し、バイオセンサを作製した。そして、実施例1と同様の試料液に対する電流応答値を測定した。その結果、血清中の総コレステロール濃度に依存した良好な応答値が得られた。次に、同様にして作製したバイオセンサを50℃で1週間保存した。そして、同様にして応答電流値を測定をした結果、血清中の総コレステロール濃度に依存した良好な応答値が得られた。また、基質を含まない試料（生理食塩水のみ）の試料に対する応答値（ブランク値）は、作製直後のセンサの値に近かった。

【0032】《実施例5》実施例1と同様にして、図1の基板1上の電極系上に、CMC層7およびレシチン層17を順次形成した。次に、実施例1と同様の厚さ0.2mmのガラスフィルタを3枚用意した。1枚目のガラスフィルタには実施例1と同様にしてフェリシアン化カリウムを担持した。ただし、滴下したフェリシアン化カリウム水溶液の濃度は0.9mol/lであり、ガラスフィルタ1平方ミリメートルあたりのフェリシアン化カリウムの担持量は0.5μmolであった。2枚目のガラスフィルタには、600units/mlのChOD水溶液を滴下し乾燥して、ガラスフィルタ1平方ミリメートルあたり0.33unitsのChODを担持し

た。3枚目のガラスフィルタには、ChEを6000units/ml、TritonX-100を9wt%含む混合水溶液を滴下し乾燥して、ガラスフィルタ1平方ミリメートルあたり3.3unitsのChEと、0.45mgのTritonX-100を担持した。

【0033】これら3枚のガラスフィルタをそれぞれ、0.66×4.5mmの大きさに裁断し、フェリシアン化カリウムを含む担体部片23、ChODを含む担体部片24、ChEおよびTritonX-100を含む担体部片25を作成した。そして、実施例1と同様の形状のカバー部材の面16に、接着剤として木工用接着剤を塗布した後、これらの担体部片を図7に示すように配置し固定した。そして、実施例4と同様にしてバイオセンサを作製し、作製直後と50℃で1週間保存した後のセンサの電流応答値を測定した。その結果、作製直後および保存後のセンサのいずれも血清中の総コレステロール濃度に依存した良好な応答値が得られた。また、保存後のセンサのブランク値は、作製直後のセンサのブランク値とほぼ同じであった。このように電子メディエーター、ChOD、およびChEと界面活性剤の混合物を別々の担体に担持することによって、さらに良好な保存特性が得られる。

【0034】《実施例6》実施例1と同様にして、図1の基板1上の電極系上に、CMC層7およびレシチン層17を順次形成した。次に、試料液供給路のカバー側の面16に、界面活性剤であるTritonX-100のエタノール溶液を滴下した。そして、エタノールを蒸発させることによって、試料液供給路のカバー側の面16に、接着剤の役割をする糊状のTritonX-100層を形成した。また、実施例1と同様の厚さ0.2mmのガラスフィルタを2枚用意した。1枚目のガラスフィルタには実施例4と同様にして、1平方ミリメートルあたり0.33μmolのフェリシアン化カリウムを担持した。また、2枚目のガラスフィルタにも実施例4と同様にして、1平方ミリメートルあたりChODを0.22units、ChEを2.2unitsおよびTritonX-100を0.3mg担持させた。これら2枚のガラスフィルタを0.33×4.5mmの大きさに3枚ずつ裁断し、フェリシアン化カリウムを含む担体部片26、ChOD、ChEおよびTritonX-100を含む担体部片27を作成した。そして、これらの担体部片26と担体部片27とを図8に示すように交互に配置し、カバー部材のスリット12のTritonX-100層上に固定した。

【0035】そして、実施例4と同様にしてバイオセンサを作製し、作製直後と50℃で1週間保存した後のセンサの電流応答値を測定した。その結果、作製直後および保存後のセンサのいずれも血清中の総コレステロール濃度に依存した良好な応答値が得られた。このように異なる試薬を担持する担体部片をそれぞれ複数個し、これ



11

らを交互に配列することにより、保存時における試薬変性を抑制するとともに、試料液浸透時の各試薬成分の混合が容易に行われ、センサの応答性が向上する。

【0036】

【発明の効果】上記のように、本発明によると、迅速かつ高精度に特定物質の濃度測定ができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた分解斜視図である。

【図2】同バイオセンサのカバーとスペーサーを重ね合わせたカバー部材で、図1とは、上下逆に配置した斜視図である。

【図3】同バイオセンサの要部の縦断面図である。

【図4】本発明の他の実施例のバイオセンサの要部の縦断面図である。

【図5】本発明の他の実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた分解斜視図である。

【図6】同バイオセンサのカバー部材の試料液供給路に担体部片を配置した斜視図である。

【図7】本発明の他の実施例におけるバイオセンサのカバー部材の試料液供給路に担体部片を配置した斜視図である。

【図8】本発明の他の実施例におけるバイオセンサのカバー部材の試料液供給路に担体部片を配置した斜視図である。

【図9】本発明のバイオセンサの担体部片の構成例を示す斜視図である。

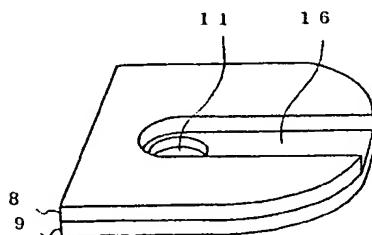
12

【図10】本発明の一実施例におけるバイオセンサの応答特性図である。

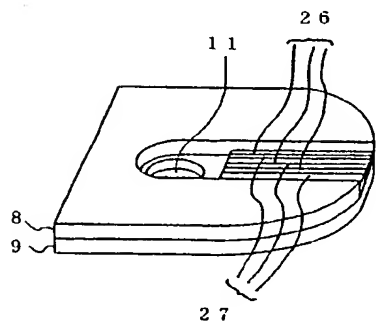
【符号の説明】

- 1 絶縁性の基板
- 2、3 リード
- 4 測定極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 CMC層
- 8 スペーサー
- 9 カバー
- 10 試料液供給路の開ロ部
- 11 空気孔
- 12 スリット
- 13 担体
- 14 接着剤
- 16 試料液供給路を構成する空間部に露出する面のカバー側の面
- 17 レシチン層
- 21、23、26 フェリシアン化カリウムを担持する担体部片
- 22、27 ChOD、ChEおよび界面活性剤を担持する担体部片
- 24 ChODを担持する担体部片
- 25 ChEおよび界面活性剤を担持する担体部片
- 28、29、30、31、32、33 担体部片

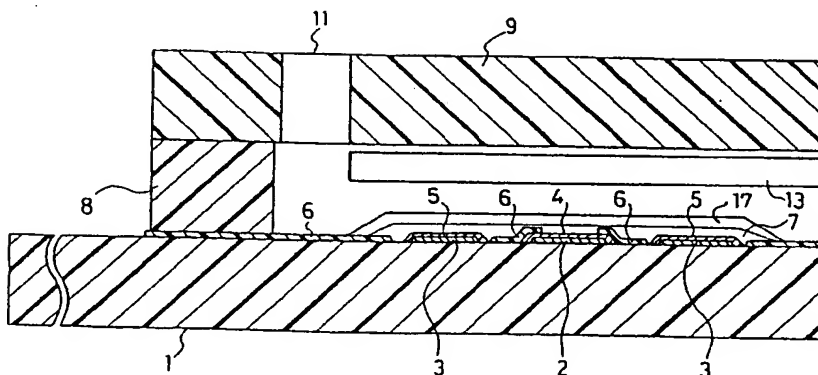
【図2】



【図8】



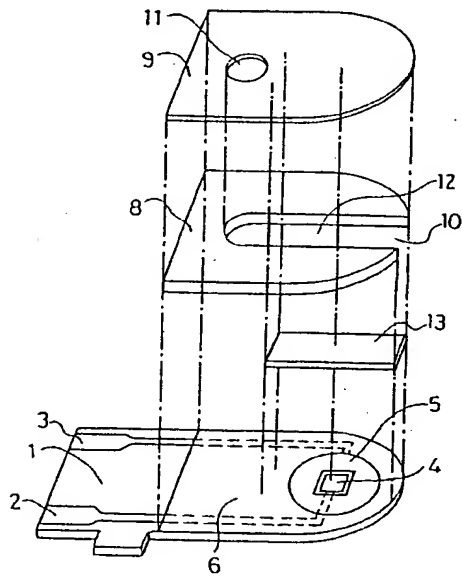
【図3】



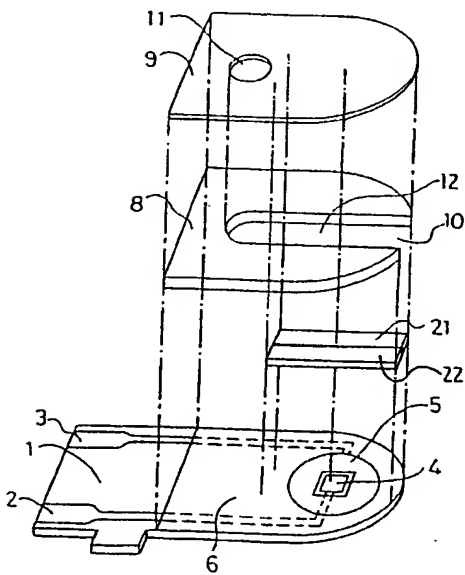


【図1】

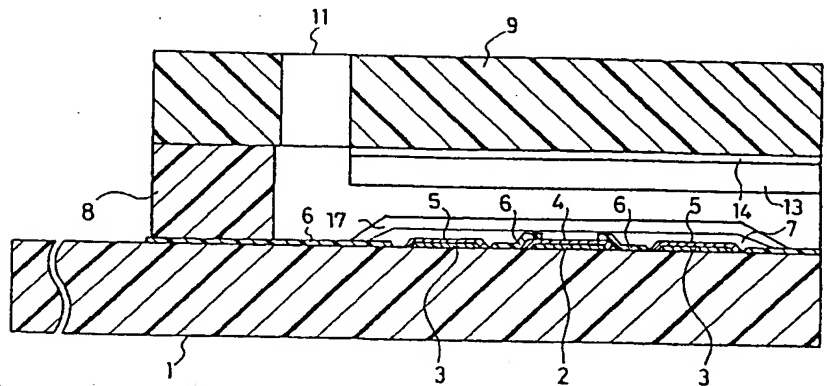
- 8 スペーサ  
 9 カバー  
 10 試料液供給路の開口部  
 11 空気孔  
 12 スリット  
 13 担体



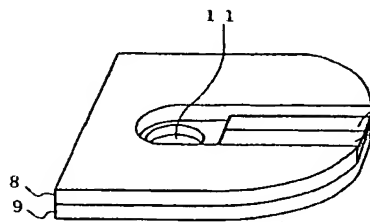
【図5】



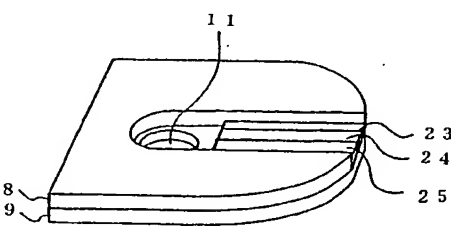
【図4】



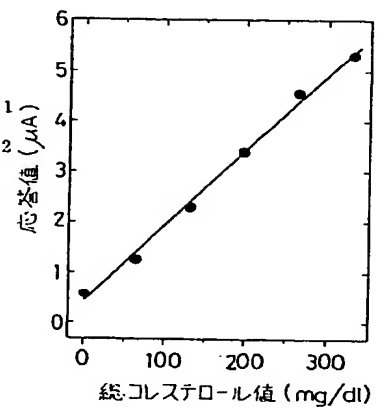
【図6】



【図7】



【図10】



【図 9】

